Aus dem physiologischen Laboratorium der II. Medizinischen Klinik
Leitung Prof. Dr. K. Felix

Lane Medical Library

Über die quantitative Bestimmung von Allantoin

Inaugural-Dissertation

vorgelegt einer

Hohen medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilian-Universität München

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

von

Willi Weiß

aus Bad Woerishofen.

Kallmünz
Buchdruckerei von Michael Laßleben
1934.

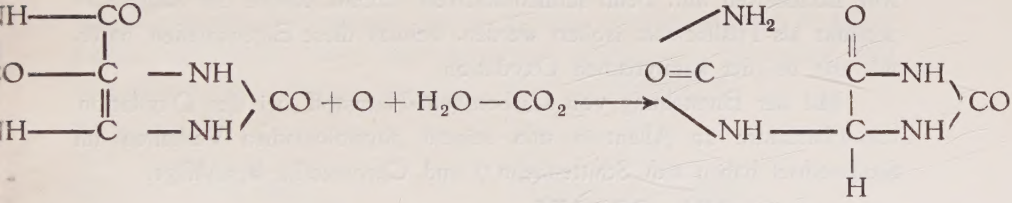
Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154014_0055

Über die quantitative Bestimmung von Allantoin[1]

Allantoin stellt das Hauptendprodukt des Purinstoffwechsels im Säugetiertorganismus dar, mit Ausnahme des Menschen, der anthropoiden Affen und der Dalmatiner Hunde. Es ist noch unentschieden, ob die vom menschlichen Organismus ausgeschiedenen, geringen Allantoinmengen endogenen Ursprungs sind. Auch im Pflanzenreich findet sich Allantoin weitverbreitet vor. Nach R. Fosse ist es vor allem enthalten in: Gramineen, Leguminosen, Rosaceen und Compositen. Als solche Einzelvertreter seien angeführt: Triticum sativum, hordeum vulgare, pisum sativum, Sc. hispanica, welche als Schwarzwurzelgemüse dient.

Überall entsteht das Allantoin aus Harnsäure. Dieser Vorgang wird von einem Ferment oder einem Sistem von Fermenten, das man als Uricase bezeichnet, geleitet. Uricase ist nachgewiesen worden in der Leber von Säugetieren und Wirbellosen. Die Uricolyse ist nach K. Felix[6]) als ein complexer Prozess bestehend aus 3 Teilreactionen aufzufassen:



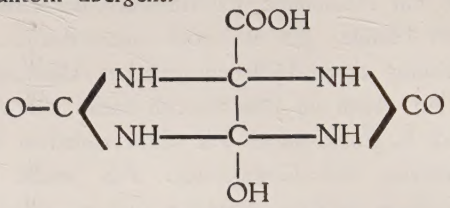
arnsäure Allantoin

Aus einer Oxydation, einer Hydrolyse und einer Decarboxylierung. Davon konnten zwei, die Oxydation und die Decarboxylierungsreaction, durch Änderung der Wasserstoffionenconcentration voneinander getrennt und gemessen werden. Für die Sauerstoffaufnahme liegt das ph-Optimum bei 8,9, für die Decarboxylierung ph bei 9,9. Zur Aufklärung der Zwischenprodukte wurde die Uricolyse in 2 Phasen zerlegt:

Oxydation des größten Teiles der Harnsäure in der ersten Phase zu einer Zwischenstufe, aus der dann in der zweiten Phase durch Abspaltung von Kohlensäure das Allantoin gebildet wird. Es konnte gezeigt werden, daß Uroxansäure kein Zwischenprodukt der biologischen Allantoinbildung darstellt.

Um den Schwierigkeiten der Darstellung des bis jetzt unbekannten Zwischenkörpers begegnen zu können stellten W. Schuler und Reindl[7]) Versuche über Oxydation von Harnsäure mit verschiedenen Oxydationsmitteln in alkalischer Lösung als Modellversuch für die Uricolyse an:

Sauerstoff, Sauerstoff + Braunstein, Sauerstoff + Eisensalze führen nach ihren Ergebnissen nicht zur Oxydation. Nur Wasserstoffsuperoxyd und Kaliumpermanganat führen Harnsäure in Allantoin über. Mit ihnen wurde der Modellversuch angestellt. Dabei entsteht Oxy-acetylen-di-urein-carbon-säure als Zwischenprodukt, die unter Abspaltung von Kohlensäure in Allantoin übergeht.

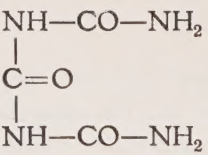


Oxy-acetylen-di-urein-carbonsäure

Oxy-acetylen-di-urein-carbonsäure vermittelt nach diesen Autoren nur den Übergang von Harnsäure in Allantoin, nicht aber den zu Oxonsäure oder Carbonyl-di-Harnstoff. Dagegen kann aus Oxy-acetylen-di-urein-carbonsäure leicht Uroxansäure entstehen.

Beim Übergang von Oxy-acetylen-di-urein-carbonsäure in Allantoin tritt Isoallantoin auf. Beim fermentatativen Abbau konnte ein Zwischenprodukt als Trisilbersalz isoliert werden, welches diese Eigenschaften hatte, wie das bei der katalytischen Oxydation.

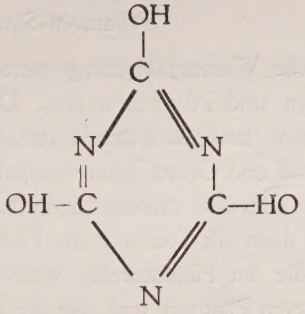
Mit der Entstehung von Carbonyl-di-Harnstoff bei der Oxydation von Harnsäure zu Allantoin und seinem physiologischen Verhalten im Stoffwechsel haben sich Schittenhelm[4]) und Chrometzka beschäftigt.



Carbonyl-di-Harnstoff

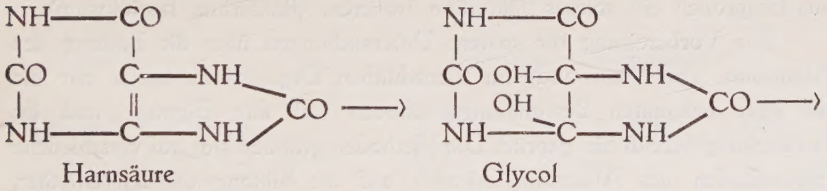
In ihren Versuchen ließen sie Wasserstoffsuperoxyd auf eine wässrige, ammoniakalische Harnsäurelösung in der Wärme einwirken. Dabei erhielten sie reichlich Carbonyl-di-Harnstoff, neben wenig Allantoin und Allantoxansaures Ammonium. Aus Carbonyl-di-Harnstoff ließ sich durch verdünnte Säuren oder Alkalien kein Harnstoff abspalten. Carbonyl-di-harnstoff wurde vom Organismus nicht abgebaut. Unter normalen Bedingungen konnte Carbonyl-di-Harnstoff niemals von ihnen im Harn aufgefunden werden. Weiterhin gelang es nicht, die als Zwischenprodukte von ihnen vermuteten Körper Allantoxaidin und Allantoxan im Harn nachzuweisen. Intravenös verabreichtes Allantoin erschien bei ihren weiteren Versuchen nahezu quantitativ im Harn. Die Allantoinmengen, die sich nach Purinreicher Kost im Harn vorfanden, überschritten die üblichen Mengen nicht.

Diesen Gedanken weiterverfolgend, daß die Wasserstoffsuperoxyd Oxydation der Harnsäure zu Allantoin als Endprodukt führt, ließen H. Wieland[5]) und Fotheringham Macrae Wasserstoffsuperoxyd auf Harnsäure unter physiologischen Bedingungen einwirken. Bei diesen Reactionen wurden schon nach 4 Stunden mehr als die Hälfte der angewandten Harnsäure oxydiert. Nach dem Eindampfen schied sich zuerst unveränderte Harnsäure ab. Bei weiterem Concentrieren Carbonyl-di-Harnstoff und Cyanursäure:

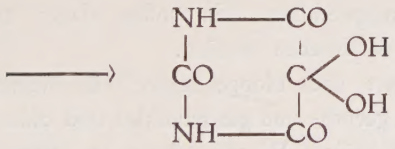


Cyanursäure

Im Gegensatz zum biologischen Abbau der Harnsäure über Oxyacetylen-di-urein-carbonsäure, führen stärkere Oxydationsmittel in saurer Lösung zu Alloxan bezw. über ein Glycol zu Allantoin. Harnsäure wird von HNO_3 zu Allantoin abgebaut. ⟨Mesoxalyl-Harnstoff⟩.



Harnsäure Glycol



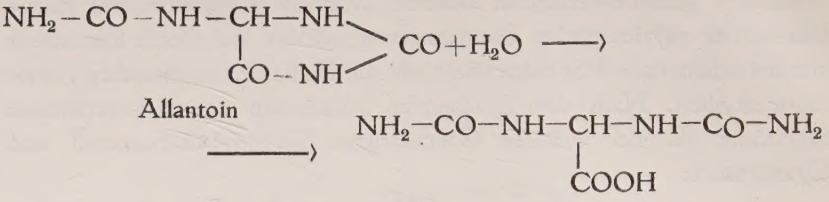
Alloxan

Durch diese Reaction gelingt es die Pyrimidinhälfte des Harnsäuremoleküls abzutrennen.

Bei weniger heftiger Oxydation der Harnsäure in neutraler oder saurer Lösung bleibt der Imidazolkern des Moleküls erhalten. Er erscheint dann in Form den Allantoins als Zwischenprodukt.

Wie bei der Harnsäure die Hydrolyse zwischen Stickstoffatom 1 und Kohlenstoffatom 6 stattfindet, so wird der Imidazolring des Allantoins unter Einlagerung von Wasser zwischen der Carbonyl-Gruppe des Glyoxyl-

säurerestes und der Imidogruppe des zugehörigen Harnstoffrestes geöffnet. Beide Bindungen können als Säure-amid Bindungen aufgefaßt werden.



Allantoin

Allantoin-Säure

Allantoinase, die die Wasseranlagerung besorgt, findet sich in den oben erwähnten Organen und Pflanzenfamilien. Die physiologische Rolle der Allantoinsäure beruht nach R. Fosse[1]) darauf, daß sie hydrolytisch äußerst leicht in Harnstoff und Glyoxylsäure gespalten wird. Die Reaktion vollzieht sich in ganz schwach saurem Medium. Die letzte Stufe des Purinstoffwechsels bildet dann die Spaltung des Harnstoffes in Kohlensäure und Ammoniak durch die im Pflanzenreich weitverbreitete Urease. Wie Asparagin bei den höheren Pflanzen und wie der Harnstoff bei den Pilzen, so kann auch die Allantoinsäure in der jungen Pflanze in größeren Mengen aufgespeichert werden.

Auch unter den Bakterien finden wir solche, die die Spaltung von Harnsäure in Allantoin vollziehen. Nach den Dooren de Jong[3]) läßt sich aus Erdproben ein solches Bakterium isolieren. ⟨Bakterium fastidiosum⟩.

Zur Vorbereitung für spätere Untersuchungen über die Bildung des Allantoins, vor allem auch im menschlichen Organismus, haben wir die bis jetzt bekannten Bestimmungsmethoden auf ihre Eignung und ihr Anwendungsbereich hin geprüft. Die Methoden gründen sich auf verschiedene Eigenschaften des Allantoins, nämlich auf die Bildung charakteristischer, leicht bestimmbarer Zersetzungsprodukte. Es sollen daher zuerst die Eigenschaften des Allantoins beschrieben werden.

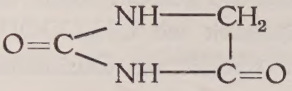
Das Allantoin kristallisiert nach Hoppe-Seyler[9]) in kleinen, durchsichtigen, weißen Prismen; ist geruch- und geschmacklos und ohne Reaktion auf Lackmus, leicht löslich in heißem Wasser, schwer in kaltem, unlöslich in Äther und kaltem absoluten Alkohol. Beim Erhitzen bräunt es sich oberhalb 220°C. und schmilzt bei 232°C.

Allantoin bildet Schwermetallverbindungen mit Silber, Blei und Kupfer. Durch ammoniakalische Silberlösung wird es aus concentrierten Lösungen gefällt, löst sich aber im Überschuß von Ammoniak wieder. Durch Quecksilber-nitrat und Quecksilberacetat bei Gegenwart von Acetationen im Überschuß wird Allantoin gefällt. $GuSO_4$ + $NaHSO_3$, Bleiacetat sowie Phosphorwolframsäure fällen salzsaure Allantoinlösungen nicht. Bei längerem

Kochen wird Fehlingsche Lösung reduziert. In wässrigen Lösungen wird Allantoin von Kohlenstoff in beträchtlicher Menge dasorbiert.

Zersetzung des Allantoins: In wässrigen Lösungen und in alkalischen Harn zersetzt sich Allantoin langsam in Glyoxylsäure und Oxalsäure. Durch Erhitzen mit concentrierter H_2SO_4 entsteht NH_3, CO_2 und CO.

Durch Kochen mit Ba $(OH)_2$: NH_3, Oxalsäure und Hydantoin

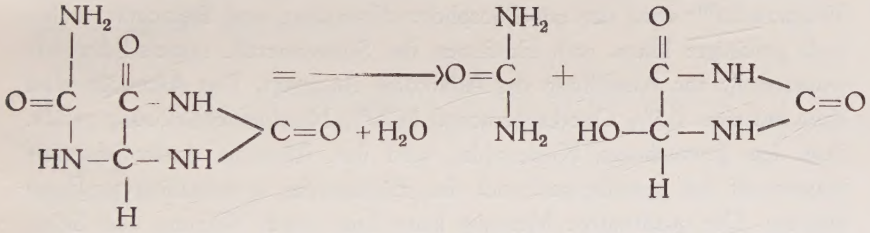


Hydantoin

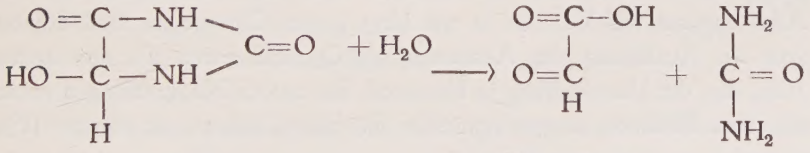
Mit concentrierter KOH bildet sich NH_3, CO_2, CH_3 COOH und $\begin{matrix}\text{COOH}\\|\\\text{COOH}\end{matrix}$

Durch kochende HNO_3 wird Allantoin in Harnstoff und Allantursäure zerlegt.

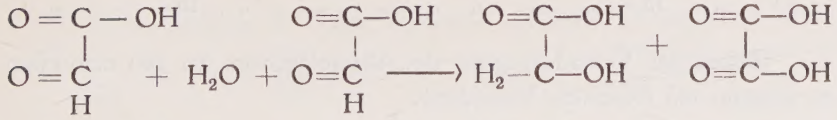
Mit Xanthydrol bildet Allantoin eine schwer lösliche Verbindung: Xanthyl-Allantoin.



Allantoin — Harnstoff — Allantursäure



Allantursäure — Glyoxylsäure



Glyoxylsäure — Glycolsäure

Zur Identification von Allantoin dient uns:

1.) der Schmelz und Mischschmelzpunkt.

2.) die Glyoxylsäurereaktion nach Adamkiewicz:

Versetzt man die alkalische Zersetzungsflüssigkeit von Allantoin mit einem Indolderivat und unterschichtet mit concentrierter H_2SO_4, so entsteht an der Berührungszone ein violetter Ring.

3.) Der Oxalsäurenachweis von Salkowski:

Zu diesem Zweck werden eine geringe Menge Allantoinkristalle mit concentrierter KOH versetzt und gekocht. Nach dem Erkalten wird die alkalische Zersetzungsflüssigkeit mit CH_3COOH ungesäuert und mit $CaCl_2$ versetzt. Sofort scheidet sich Calziumoxalat ab.

4.) Überführung in Harnstoff

5.) Fällung als Xanthydrol — Allantoinverbindung

Nun beruhen die bisherigen Allantoinbestimmungen entweder auf der Bildung schwer löslicher Verbindungen mit Schwermetallen oder aber der Überführung des Allantoins in Harnstoff, wobei dieser durch Zersetzung mit Urease oder Fällung durch Xanthydrol bestimmt wird. Nach Wiechowski[10]) wird der mit Phosphorwolframsäure und Bleiacetat mehrmals gereinigte Harn, nach Entfernen der Schwermetalle mittels Schwefelwasserstoff, zur Ausfällung des Allantoins eingeengt. Das Allantoin wird dann mit einer 0,5% Quecksilberacetat in 20% Natriumacetatlösung gefällt. Aus dem gewaschenen Niederschlag wird das Allantoin durch Schwefelwasserstoff frei gemacht und nach dem Eindampfen in kristallisierter Form erhalten. Die quantitative Messung kann dann durch Wägung oder Stickstoff bezw. Quecksilberbestimmung des Niederschlages erfolgen. Da naturgemäß bei Arbeiten mit menschlichem Harn das Auskristallisieren des Allantoins zu viel Verluste in sich birgt, gingen Chrometzka und Schnoor von der Ausfällung des Allantoins als Quecksilbersalz ab, den andern Weg, den der Umwandlung in Harnstoff. Bei unsern Nachprüfungen erwies sich diese Methode als gut brauchbar mit einer Fehlergrenze von 8—11%.

1.) eingew. 46,8 mgr All. in 200 ccm Harn ermit. 42,3 mgr. All.
2.) „ 18,7 „ „ „ „ „ „ „ „ 16,2 „ „

(Betreff der Vernachlässigung des Allantoingehalts der 200 ccm Harn in obigem und folgenden Versuchen).

Auf Grund der Reaction von Salkowski versuchten wir festzustellen, ob die aus Allantoin beim Kochen mit Alkali entstehende Oxalsäuremenge constant bleibt und somit als Bestimmungsmethode angewandt werden könnte. Es wurde nun in wässrigen Allantoinlösungen die durch Kochen mit concentrierter Kalilauge auftretenden Oxalsäuremengen ermittelt:

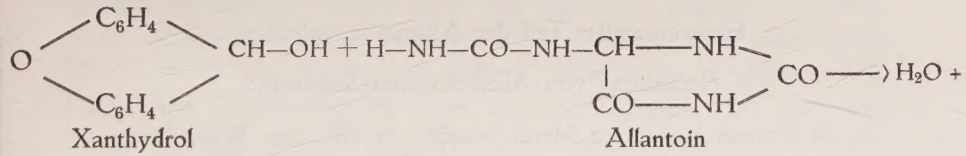
1.) eingew. 304 mgr. Allantoin ermit. 77 mgr. Oxalsäure
2.) „ 207,3 „ „ „ 52,5 „ „
3.) „ 99,5 „ „ „ 25,2 „ „
4.) „ 43,4 „ „ „ 11 „ „

Das Verhältnis von eingewogenem Allantoin zu ermittelter Oxalsäure betrug 3,9479. Diese Resultate ließen die Anwendung obiger Methode auf den Harn als Aussichtsreich erscheinen.

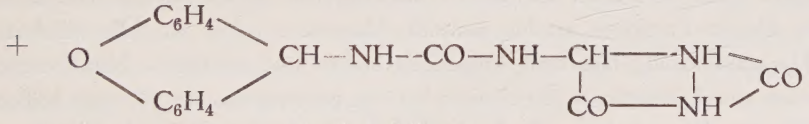
Anwendung der Oxalsäuremethode auf den Harn:

200 ccm Harn eingew. 198,2 mgr All. ermit. 47,5 mgr. Oxalsäure Multipliziert man diesen gefundenen Wert mit dem Factor 3,9479, so ergeben sich 187,5 mgr Allantoin, was einer Fehlergrenze von 5,35% entspricht.

Da die bisher geschilderten Methoden als indirekte den Fehler der Umwandlung des Allantoins in sich tragen, versuchten wir über die von R. Fosse hergestellte Allantoin-Xanthydrolverbindung das Allantoin direkt zu fassen. Hier stellten wir wiederum wässrige Lösungen her, um darin zuerst die untere Grenzconcentration für die Ausfällung des Allantoins mit Xanthydrol zu bestimmen.



Xanthydrol Allantoin



Xanthyl-Allantoin

Die Versuche ergaben als Ausfällungsgrenze eine 0,36% wässrige Allantoinlösung. Weiterhin lieferte diese Methode in wässrigen Lösungen nahezu quantitative Werte:

1.) eingewogen 92 mgr. Allantoin ermittelt 91,2 mgr. All.
2.) „ 55,7 „ „ „ 54,3 „ „
3.) „ 15,6 „ „ „ 15,1 „ „

Bei Anwendung auf den Harn wies diese Methode dagegen eine Fehlergrenze von ungefähr 20% auf. Rund $^1/_5$ der eingewogenen Allantoinmenge konnte nicht erfaßt werden.

Betrachten wir die 3 geschilderten Bestimmungsmethoden, so kommen wir zu folgendem Schluß:

Bei höheren Allantoinconcentrationen liefert die Oxalatmethode hinreichend genaue Werte und ist ihrer Einfachheit wegen den andern Methoden vorzuziehen. Bei geringen Concentrationen ist für genaue Bestimmungen die Methode nach R. Fosse mit Vorschrift nach Chrometzka zu wählen. Was die direkte Methode ‹Xanthyl-Allantoin› betrifft, so ist sie auf die Fälle anzuwenden, trotz ihrer hohen Fehlergrenze, in denen es sich um die absolut sichere Identification von Allantoin handelt.

Ausführung von Allantoinparallelbestimmungen mittels der 3 Methoden im Harn stoffwechselgesunder und hypophysengeschädigter Patienten:

Jetzt haben neuerdings Chrometzka und Schnoor bei Hypophysengeschädigten, im besonderen bei Diabetes insipidus, mit Hilfe der Xanthydrol-Harnstoffbestimmungsmethode eine Mehrausscheidung von Allantoin festgestellt. Wir konnten in einer 24 Stundenportion von 1180 ccm Harn einen Allantoingehalt von ca. 19 mgr in einer 48 Stundenportion von 5700 ccm Harn ‹Diabetes insipidus› einen solchen von 76—80 mgr, in einer 24 Stundenportion von 1815 ccm Harn ‹hypophysäre Kachexie› einen solchen von 36 mgr feststellen. In dem vorliegendem Fall von Diabetes insipidus war die Allantoinausscheidung nicht erhöht.

Experimenteller Teil der Allantoinausscheidung:

Herstellung von Allantoin nach Sundwick:

50 Gramm Harnsäure Merck wurden in 500 ccm Wasser suspendiert. Man fügt unter Erwärmen auf ungefähr 80°C. solange Ätznatron in kleinen Portionen zu bis sämtliche Harnsäure gelöst ist. Die alkalische Harnsäurelösung läßt man einige Zeit stehen und abkühlen. Nun bereitet man eine Lösung von 30 Gramm Kalium permanganat in 400 ccm heißem Wasser. Die erkaltete, alkalische Harnsäurelösung wird mit der erkalteten Kaliumpermanganatlösung unter langsamen Zufließen versetzt. Das Reactionsgemisch färbt sich zunächst grün. Nach ungefähr einer halben Stunde ist die Reaction beendet und die Lösung vollständig entfärbt. Jetzt filtriert man vom ausgeschiedenen Braunstein ab, säuert mit Essigsäure an und dampft auf dem Wasser-bad zur Kristallisation ein. Das Rohprodukt wurde in 50 ccm heißem Wasser umkristallisiert und mehrmals mit 96 % Alkohol gewaschen. Die Ausbeute betrug 17,5 Gramm reines, wasserfreies Allantoin.

Identification des erhaltenen Produktes:

Schmelzpunct betrug 227° C, der Stickstoffgehalt nach Kjehldahl 35,34% (theoretisch 35,42 %). Eine geringe Menge der erhaltenen Kristalle wurden mit concentrierter NaOH gekocht. Ein Teil der alkalischen zer-

setzungsflüssigkeit wurde mit CH_3COOH angesäuert und mit 10 % $CaCl_2$ versetzt. Es entstand sofort ein kristallinischer Niederschlag, der abfiltriert wurde. Dieser Niederschlag wurde mit verdünnter H_2SO_4 angesäuert und mit weinroter $KMnO_4$-Lösung versetzt. Der Niederschlag löste sich und gleichzeitig entfärbte sich die Lösung. Während dieser Reaction entwickelten sich Gasblasen, die mit $Ba(OH)_2$ als Co_2 identifiziert wurden. Damit ist der Nachweis erbracht, daß es sich um Oxalsäure handelt.

Der andere Teil der alkalischen Zersetzungsflüssigkeit wurde mit stark indicanhaltigem Harn versetzt und mit concentrierter H_2SO_4 unterschichtet. Sofort trat an der Berührungszone ein violettfarbener Ring in Erscheinung. (Glyoxylsäure Reaktion). Schmelzpunkt, Stickstoffgehalt, Glyoxylsäurreaction und beim Kochen mit concentrierten Alkalien entstandene Oxalsäure erweisen eindeutig die Allantoin-Natur des erhaltenen Produktes.

Bestimmung von Allantoin mittels der Titrationsmethode von Handowski:

Nach Handowski[11]) läßt sich das Hg durch Titration mit Rhodan quantitativ bestimmen. Handowski ging nun weiter so vor, daß gewogene Mengen Allantoin in Wasser gelöst und mit einem gemessenen Überschuß Wiechowski-Reagens versetzt wurden. Nach etwa einer halben Stunde wurde vom Niederschlag abfiltriert und in einem aliquoten Filtratsteil das überschüssige Hg durch Titration bestimmt. Die gefundene Menge Hg wird auf das Ausgangsvolumen berechnet und von der zugesetzten Menge abgezogen. Die Differenz ergab die Menge des von Allantoin gebundenen Hg, dabei zeigte sich, daß gleiche Mengen Allantoin gleiche Mengen Hg binden. Das Verhältnis n/10 Hg: n/10 Allantoin (Q genannt) war in 15 Versuchen: 54,31 : 15=3,62

Es bindet also 1 Mol Allantoin 3,62 Äquivalente Hg. Die Verbindung hätte die Zusammensetzung 5 Allantoin + 9 HgO.

$$\text{Aus dem obigen Quotienten } Q = \frac{\text{ccm n/10 Hg}}{\text{ccm n/10 All.}} \text{ oder in Gramm}$$

$$\text{(M. G. von Allantoin} = 158)\ Q = \text{ccm n/10 Hg.} \frac{0{,}0158}{\text{G All.}}$$

ergibt sich zunächst für die Berechnung, daß man die abgelesene Zahl ccm NH_4SCN mit 0,0158 : 3,62=0,00436 multiplizieren muß, um die Menge Allantoin in Gramm zu erhalten.

Ausführungsbestimmungen nach Handowski:

Man verdünnt, den zu analysierenden Harn so, daß er ungefähr 1 % Harnstoff enthält, säuert mit 1 % H_2SO_4 und CH_3COOH an, fällt

mit Phosphorwolframsäure, filtriert, entfernt überschüssige Phosphorwolframsäure und H_2SO_4 mit PbO und anwesendes Cl mit CH_3COO-Ag und CH_3COOH. Mittels H_2S beseitigt man das Pb und Ag, verjagt den H_2S durch Erwärmen, filtriert und neutralisiert mit $CaCO_3$. Jetzt versetzt man die neutralisierte Lösung mit abgemessenem, überschüssigem Allantoinreagens. (Eine Lösung von 0,5% Hg $\begin{matrix} - \\ - \end{matrix}$ $\begin{matrix} COOCH_3 \\ OH \end{matrix}$ und 20% $CH_3COO-Na$). Filtriert den entstandenen Niederschlag ab, versetzt einen aliquoten Teil des Filtrates mit 10 ccm Eisen-ammonium-alaun und verdünnter H_2SO_4. Nun beginnt man die Titration mit 1/10 n NH_4SCN-Lösung bis zum Auftreten einer Gelbfärbung. Die Menge der verbrauchten NH_4SCN-Lösung in ccm, multipliziert mit 0,00436, gibt an wieviel Gramm Allantoin in der zur Titration verwandten Flüssigkeit enthalten waren.

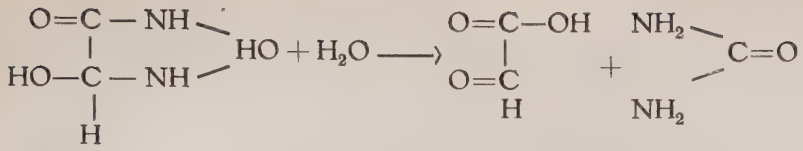
Kontrolle obiger Methode in wässrigen Allantoinlösungen: 198,2, 120,5, 75,3, 27,4 mgr Allantoin wurden abgewogen und in 100 ccm Wasser gelöst. Um nach Vorschrift eine ungefähre 1% Harnstofflösung herzustellen, wurden jeder der 4 Portionen 1 Gramm Harnstoff zugefügt. Die gefundenen Werte der beiden ersten Proben waren:

157 mgr (198,2 mgr eingewogen) und 102,4 mgr Allantoin. (eingewogen 120,5 mgr). Diese beiden Resultate weisen also einen Fehler von ungefähr 20% nach unten auf. Bei der nächsten Probe mit 75,3 mgr konnten nur 39,8 mgr ermittelt werden, was nahezu nur der Hälfte der eingewogenen Substanzmenge entspricht Da bei der letzten Bestimmung beim Zusatz des ersten Tropfens 1/10 n NH_4SCN-Lösung sich verschiedene Farbmischungen zeigten, konnte diese Probe überhaupt nicht zu Ende titriert werden. Aus diesen 4 Bestimmungen ergibt sich, daß schon bei sehr hohen Allantoinconcentrationen, wie sie in Körperflüssigkeiten nicht vorkommen, unsichere Resultate erhalten werden. Bei Allantoinconcentrationen, die sich den in den Körperflüssigkeiten nähern, sind die erfaßten Mengen zu gering. Zusammenfassend läßt sich hiefür diese Titrationsmethode als vollständig ungenügend erachten.

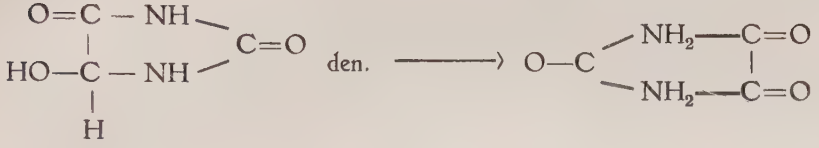
Bestimmung des Allantoins als Oxalat:

Dieser Methode liegt folgende Tatsache zugrunde:

Nach Christmann entsteht durch Alkalihydrolyse des Allantoins zunächst Allantursäure und dann Parabansäure und Hydantoin. Da sich bei dieser Reaktion aus Allantursäure auch eine gewisse Menge Glyoxylsäure bildet, die nicht weiter reagiert, so ist die Bildung von 1 Mol Oxalsäure aus 2 Mol Allantoin nicht absolut quantitativ. Parabansäure zerfällt dann in Oxalsäure und Harnstoff.



Glyoxylsäure Glyoxylsäure

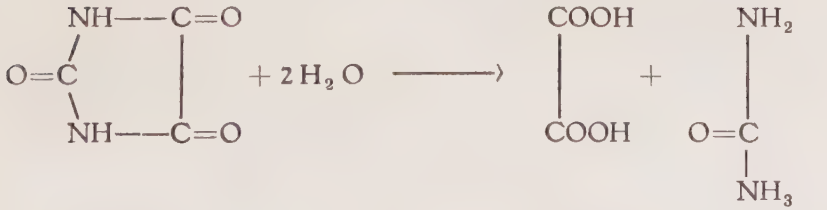


Allantursäure Parabansäure

Parabansäure Oxalursäure

Nach Karrer[12] kann die Reduktion der Parabansäure so geleitet werden, daß Hydantioin entsteht:

Parabansäure Hydantoin



Parabansäure Oxalsäure Harnstoff

Anwendung unserer Methode auf wässrige Allantoinlösungen:

Die wässrige Allantoinlösung wird auf ein kleines Volumen gebracht und mit reichlich Ätznatron versetzt. Man kocht solange, aber mindestens eine Stunde, bis in den abgehenden Wasserdämpfen mit Lackmus kein NH_3 mehr nachweisbar ist. Die bei dieser Reaction sich bildende $\begin{matrix}COOH\\COOH\end{matrix}$ wird mit $KMnO_4$ in H_2SO_4 – Lösung titriert.

1.) Eingewogen: 304 mgr. Allantoin ermittelt 77 mgr. Oxalsäure
2.) „ 207,3 „ „ „ 52,5 „ „
3.) „ 99,5 „ „ „ 25,2 „ „
4.) „ 43,4 „ „ „ 11,0 „ „

Die Resultate dieser unserer eigenen Analysen zeigen ein Verhältnis von eingewogenem Allantoin zu ermittelter Oxalsäure von 3,9479.

Anwendung der Oxalatbestimmung auf den Harn:

200 ccm Harn, dessen Eigenallantoingehalt wie eingangs schon erwähnt vernachlässigt werden kann, wurden 198,2 mgr. Allantoin zugesetzt. Die Lösung wurde mehrmals mit Phosphorwolframsäure, Pb $\begin{matrix}-CH\\-OH\end{matrix}_3$ COO und $HgSO_4$ gefällt und gereinigt, die Niederschläge jeweils abfiltriert und überschüssiges Pb mittels H_2S entfernt. In dem gereinigten, eingeengten Filtrat nahmen wir eine Fällung der später hinderlichen $Ca^{\cdot\cdot}$ vor. Zu diesem Zweck macht man schwach ammoniakalisch, fällt mit Na_2HPO_4 und filtriert von dem entstandenen $CA_3\langle PO_4\rangle_2$ — Niederschlag ab. Das Filtrat wird, um die Allantoinconcentration noch zu erhöhen eingeengt. Der bei dieser Bestimmung ermittelte Wert für Oxalsäure betrug 47,5 mgr. Multipliziert man diesen gefundenen Wert mit dem Factor 3,9479, so errechnen sich 187,5 mgr. Allantoin, was einer Fehlergrenze von 5,35% entspricht.

Bestimmung des Allantoins als Xanthydrol-Harnstoff:

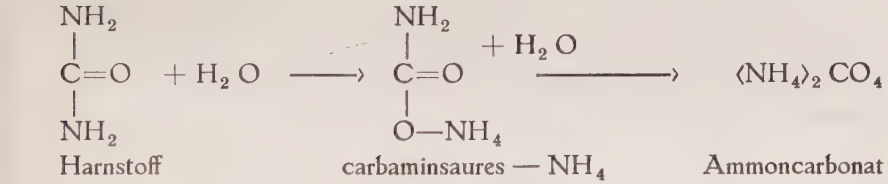
Vorschrift nach Chrometzka[13]):

„500 ccm Harn werden mit 1 % H_2SO_4 und 2% Eisessig angesäuert und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Das Filtrat wird mit PbO bis zu alkalischen Reaction geschüttelt und nach mehrstündigem Stehen abgenutscht. Nach Entfernen des Pb als Sulfid wird mit MgO alskalisch gemacht, das Volumen festgestellt, mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und mit 2 % Hg $\begin{matrix}-CH\\-OH\end{matrix}_3$ COO ⟨in etwas heißem Wasser gelöst⟩ gefällt. Eine vorherige Entfernung der Cl' hält Vf. wegen des großen Hg-Überschusses für überflüssig. Die Hemmung der Allantoin-Hg-fällung durch Cl' beruht nur auf der geringen Dissoziation des $HgCl_2$. Nach 24 stündigem Stehen wird filtriert, wenig gewaschen, der Niederschlag in 60 — 70 ccm 5% CH_3COOH unter Erwärmen gelöst. Nach dem Erkalten 12 Stunden stehen lassen; dabei bleibt Allantoin bei der in Frage kommenden Concentration sicher in Lösung, während eine beträchtliche Fraction anderer in ihrer Zusammensetzung uns nicht bekannter Stoffe ausfallen. Im Filtrat wird das Hg als Sulfid entfernt, durchlüftet und mit wasserfreier Soda

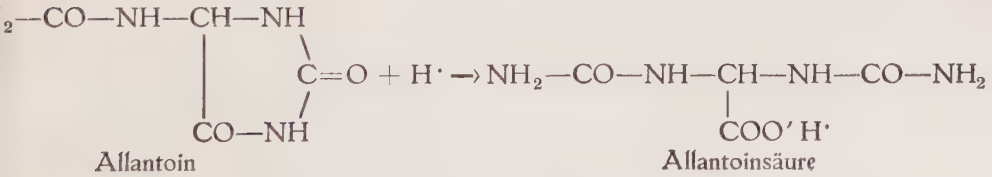
(nicht vollständig) neutralisiert. Nach Zusatz von 1% Sojabohnenmehl und einigen Tropfen $CHCl_3$ wird die fermentative Spaltung bei 37°C durchgeführt. Dabei ist wesentlich, daß der Harnstoff vollständig hydrolysiert wird. Zur Kontrolle dient uns die Reaction nach Barrenschen und Weltmann:

(Prüfung mit Urease siehe später). Harnstofflösungen geben noch in großer Verdünnung mit einem Tropfen des Ehrlichschen Reagens eine zeisiggrüne Färbung. Nach dem negativen Ausfall dieser Reaction beläßt man das Reactionsgemisch noch etwa 2 Stunden im Brutschrank, dann wird tropfenweise H_2SO_4 bis zur congosauren Reaktion zugesetzt, 30 Minuten auf 60°C erhitzt nach Zusatz von etwas $CH_3COO{=}Na$ durch Aufkochen enteiweißt und filtriert. Die Menge des Filtrates wird gemessen und darin die übliche Xanthydrolfällung vorgenommen. Durch Wägung des Niederschlages und Multiplikation mit dem Factor 0,188 erhält man die Allantoinmenge, die auf die Ausgangsmenge umgerechnet wird."

Nach R. Fosse[14]) liegt dieser Methode folgende Reaction zugrunde: Durch Sojabohnenmehl wird Harnstoff zu Ammoncarbonat und Allantoin zu Allantoinsäure hydrolysiert.

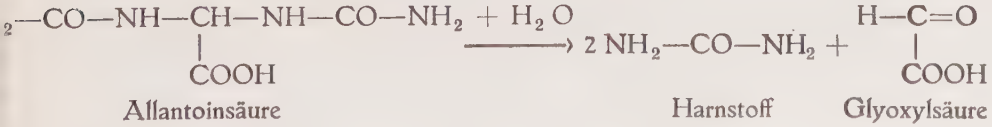


Harnstoff — carbaminsaures — NH_4 — Ammoncarbonat



Allantoin — Allantoinsäure

Allantoinsäure gibt beim Erhitzen in schwach mineralsaurer Lösung Harnstoff, dessen Menge gravimetrisch als Xanthydrolverbindung bestimmt wird.



Allantoinsäure — Harnstoff — Glyoxylsäure

Abweichend von Chrometzkas Vorschrift nahmen wir eine mehrmalige Reinigung des Harnes nach Wiechowskis Vorschlag vor. (Phosphorwolframsäure, Pb $\begin{matrix} - CH_3 \\ - OH \end{matrix}$ COO und dann nochmals mit $HgSO_4$). An Stelle

von MgO, das immer eine gewisse Menge colloidales Mg $(OH)_2$ bildet und abfiltriert werden muß, verwendeten wir zur Neutralisation $NaHCO_3$. Um sicher festzustellen, ob durch die fermentative Spaltung aller Harnstoff zerstört ist, führten wir vor der Xanthydrolfällung eine quantitative Harnstoff-Stickstoffbestimmung durch. Diese Bestimmungen zeigten, daß der von der Spaltung unberührt gebliebene Harnstoff sich unter 0,5 mgr. bei einer Ausgangsmenge von 500 ccm Harn bewegt. Diese Ergebnisse lassen den absolut sichern Schluß zu, daß keine wesentlichen, anderweitigen Harnstoffmengen mitbestimmt werden.

1.) 200 ccm Harn eingewogen 46,8 mgr. All. ermit. 42,3 mgr.
2.) „ „ „ „ 18,7 „ „ „ 16,2 „

Diese beiden Resultate zeigen, daß bei höheren Allantoinconcentrationen sich die Fehlergrenze unterhalb 10% bewegt, bei stärkerer Abnahme der Allantoinconcentration die Fehlergrenze aber auf etwas über 10 % steigt.

Direkte Allantoinbestimmungsmethode:

Der Oxalat — wie der Xanthydrol-Harnstoffbestimmung haftet der Fehler der Überführung des Allantoins einerseits in Oxalsäure, andererseits in Harnstoff an. Um nun den Nachweis zu erbringen, daß tatsächlich nur Allantoin erfaßt wird, versuchten wir über die Xanthyl-Allantoinverbindung eine direkte Bestimmungsmethode auszuarbeiten.

Herstellung der Xanthyl-Allantoinverbindung:

Vorschrift nach R. Fosse[15]):

In 20 ccm heißem Wasser werden 1 Gramm Allantoin gelöst, hierauf werden 20 ccm Eisessig zugefügt und dasselbe Volumen methylalkoholische 10% Xanthydrol-Lösung. Ziemlich rasch bildet sich eine kristallinische Ausscheidung von länglichen, weißen Kristallen, die in CH_3OH weiter gereinigt werden. Diese Kristalle weisen einen Smp. von 214/215°C auf. 1,5 Gramm Allantoin wurden in 10 ccm heißem Wasser gelöst, dem 15 ccm Eisessig zugesetzt werden. Diese Lösung wurde langsam mit 20 ccm einer 10% methylalkoholischen Lösung von Xanthydrol versetzt. Nach 4 tägigem Stehen bildete sich eine weiße, kristallinische Ausscheidung, die abfiltriert und mehrmals in Methylalkohol gereinigt und gewaschen wurde. Die getrockneten, wasserfreien Kristalle wiesen einen Smp. von 217/218°C und einen Stickstoffgehalt von 19,25% auf. (theoretisch N=19,4%). Nach der Herstellung dieser Verbindung gingen wir daran das Minimum der Ausfällungsconcentration der Xanthylallantoinverbindung zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden 0,1: 0,2: 0,3: 0,4: 0,5: 0,8: 1,0: 2,0: 10,0 % wässrige Allantoinlösungen hergestellt, diese

Lösungen wurden mit der entsprechenden Menge Eisessig und 10% methylalkoholischen Xanthydrol-Lösung versetzt. Nach 3 Tagen zeigte sich ein Kristallisationsbeginn bei der 0,4% Allantoin-Lösung. Bei den weiteren Untersuchungen, der zwischen 0,3 und 0,4% liegenden Werte, entsprach 0,36% dem Ausfällungsminimum.

Nach dem die in wässrigen Lösungen ausgeführten Bestimmungen die Xanthylallantoinverbindung als brauchbare Bestimmungsmethode für Allantoin dargetan haben, gingen wir daran diese Methode quantitativ auszuwerten. .

1.) 100 ccm Wasser eingew. 92 mgr. Allant. ermittelt 91,2 mgr.
2.) „ „ „ „ 55,7 „ „ „ 54,2 „
3.) „ „ „ „ 15,6 „ „ „ 15,0 „

Diese Werte zeigen, daß diese Methode für wässrige Allantoinlösungen nahezu quantitative Werte liefert. .

Anwendung obiger Methode auf den Harn:

1.) 200 ccm Harn eingew. 87,4 mgr. Allant. ermittelt 81 mgr.
2.) „ „ „ „ 61,5 „ „ „ 49,2 „
3.) „ „ „ „ 42,8 „ „ „ 34,3 „
4.) „ „ „ „ 26,4 „ „ „ 18,9 „
5.) „ „ „ „ 16,8 „ „ „ 13,2 „

Zu 1.) Smp. 214 Grad MSmp. 210 Grad N-Gehalt 18,87%
„ 2.) „ 218 „ „ 214 „ „ 19,12%
„ 3.) „ 217 „ „ 215 „ — — —
„ 4.) „ 214 „ „ 212 „ — — —
„ 5.) „ 216 „ „ 215 „ — — —

Die gefundenen Allantoinwerte zeigen eine Fehlergrenze von ungefähr 20% auf. Rund $^1/_5$ der eingewogenen Allantoinmenge konnte nicht erfaßt werden.

Betrachten wir zusammenfassend die 4 Bestimmungsmethoden, so kommen wir zu dem Schluss, daß die Rhodanid-titrationsmethode aus der Diskussion ausscheidet.

Bei höheren Allantoinconcentrationen leistet die Oxalatmethode ausgezeichnete Dienste und ist ihrer großen Einfachheit wegen den anderen Methoden vorzuziehen. Sie liefert bei einer Concentration von ungefähr 20 mgr.%, welche durch Einengen der Lösung erhalten werden muß, hinreichend genaue Werte.

Für Allantoinconcentrationen in physiologischen Flüssigkeiten, in denen die vorher angegebene Concentration nicht erreicht werden kann, ist für genaue Bestimmungen die Xanthydrol-Harnstoff-Methode (Vorschrift nach Chrometzka) zu wählen.

Was die direkte Bestimmungsmethode ‹Xanthydrol-Allantoinverbindung› betrifft, so ist sie trotz ihrer 20 % Fehlergrenze für die Fälle die Methode der Wahl, in denen es sich um die absolut sichere Erfassung und Identification des gefällten Allantoins handelt. Aus diesen Ausführungen geht hervor, daß jede der 3 Methoden einem Indicationsbereich zugeteilt werden kann.

Parallelbestimmungen von Allantoin im Harn Stoffwechselgesunder, eines Diabetes insipidus und einer hypophysären Kachexie mittels der 3 Methoden:

Nach Abschluß der Prüfungen über die Leistungsfähigkeit der einzelnen Bestimmungsmethoden gingen wir daran Untersuchungen in menschlichen Urinen über Mehrausscheidung von Allantoin anzustellen.

Ergebnisse der Untersuchungen sind:

Bauer M. II. Med. Kl. 1180 ccm Harn 24 Stundenportion

I.) Oxalatmethode 18,7 mgr Allantoin
II.) Xanthydrol-Harnstoffmethode 21,3 „ „
III.) direkte Xanthyl-Allantoinmethode 14,2 „ „

Diabetes insipidus H. W. 5700 ccm 48 Stundenportion

I.) Oxalatmethode in 48 Stport. (83,6 mgr) $^1/_2$ 41,8 mgr Allantoin
II.) Xanthyrol-Harnstoffm. „ 76,4 „ „ 38,2 „ „
III.) Direkte Xanthyl-Allantm. „ 67,2 „ „ 33,6 „ „

Wie schon oben am Schluß unserer theoretischen Erwägungen ausgeführt ist, konnten wir die von Chrometzka für Diabetes insipidus gefundene Mehrausscheidung von höheren Allantoinmengen nicht erhalten.

Hypophysäre Kachexie 1815 ccm 24 Stundenportion

II.) Xanthydrol-Harnstoff-methode 36 mgr Allantoin

Aus den Bestimmungen des Falles I. (Bauer Maria) ergibt sich, daß wir den Allantoingehalt von 200 ccm Harn als Lösungsmittel in unseren Versuchen vernachlässigen können.

Literaturverzeichnis.

1) R. Fosse, P. de Graeve u. P. E. Thomas Chem. Zentrbl. 1933 II. 1/400
2) „ „ „ „ „ 1929 I. 1930
2) Fosse u. Brunel chem. Zentrbl. 1930 I. 2444
3) Dooren de Jong Bact. Zentrbl. II. Abt. 79 344
4) Schittenhelm Z. phys. Chem. 1927 203 u. f.
5) H. Wieland „ „ „ 203 83–86 1931
6) K. Felix Kl. Wochschr. 7/293–295 1930
6) „ Z. f. phys. Chem 180
7) W. Schuler u. W. Reindl Chem. Zentrbl. 1933 I./II. 2565
8) Karrer Lehrb. d. org. Chem. 1928 763
9) Hppe-Seyler-Thierfelder 1924 154
10) Wiechowski Analyse des Harns 1913 1076
11) Handowski Z. f. phys. Chem. 1914 103
12) Karrer Lehrb. d. org. Chem. 1928 275
13) Chrometzka Z. f. d. ges. exp. Med. 1932 278
14) R. Fosse L'ur'e 1928 218
15) R. Fosse „ „ 216

Lebenslauf.

Weiß Wilhelm geboren zu Schwabmünchen 17. Oktober 1907, trat 1918 in das humanistische Gymnasium St. Stephan zu Augsburg in die 1. Klasse ein, besuchte von der 4. Klasse ab das Realgymnasium zu Augsburg. Siedelte 1926 nach München um, wo er 8. und 9. Klasse des A.R.G. zu München Siegfriedstr. besuchte. Legte im März 1928 hier das Absolutorium ab und trat im Sommersemester 1928 in die med. Facultät der Universität zu München ein. Verbrachte das Wintersemester 1928/29 an der Universität Freiburg/Br. Legte dann in München Physikum und Staatsexamen ab, welch letzteres im Herbst 1933 erfolgte. Trat am 25. 1. 1934 in das praktische Jahr in der Med. Pol. Kl. und nach 3 Monaten in die 2. Med. Kl. zu München ein, wo er heute noch beschäftigt ist.